Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
13(5):320-327, setembro-outubro, 1971

CDU 616.928.188

ANTICUERPOS PRECIPITANTES ESPECIFICOS DE LA BLASTOMICOSIS SUDAMERICANA REVELADOS POR INMUNOELECTROFORESIS

Luis A. YARZABAL [1]

RESUMEN

Se aplicó la inmunoelectroforesis al estudio de los anticuerpos precipitantes en muestras de suero de 20 pacientes de blastomicosis sudamericana, empleando como antígeno un preparado "mixto", mezcla de fracciones "celulares" y "metabólicas" de la fase miceliana de *P. brasiliensis*.

Diecinueve enfermos demonstraron poseer precipitinas contra el hongo, originando entre 1 y 13 arcos de precipitación.

La superposición de todos los inmunoelectroforegramas permitió individualizar 20 fracciones antigénicas en los extractos empleados.

Una de ellas, caracterizada por migrar hacia el cátodo, reveló el anticuerpo correspondiente en todos los casos positivos, formando con él un arco mayor de los diagramas, que ha sido denominado provisoriamente arco E. Este sistema precipitante no se formó cuando empleamos antígenos heterólogos, ni en el grupo de enfermos de histoplasmosis. La doble difusión en gel de agarosa fue positiva en los mismos enfermos, generando de 1 a 12 bandas de precipitación. Ambas pruebas mostraron que un número apreciable de enfermos de blastomicosis sudamericana tiene anticuerpos contra *H. capsulatum* y *B. dermatitidis*. Cuatro entre 5 enfermos de histoplasmosis formaron sistemas precipitantes ante antígeno "mixto" de *P. brasiliensis*. Tres de estos pacientes tenían también precipitinas contra *B. dermatitidis*.

INTRODUCCIÓN

El análisis inmunoelectroforético ha sido aplicado exitosamente al estudio inmunológico de múltiples micosis.

Su introducción en la Micología ha permitido realizar el análisis estructural de diversos antígenos fúngicos (BIGUET & col.[3]); identificar el equipamiento enzimático de extractos antigénicos de varias especies de hongos patógenos para el hombre (TRAN VAN KY & col.[12]; BIGUET & col.[4]); y determinar la importancia de los anticuerpos precipitantes en el diagnóstico de la aspergilosis (BIGUET & col.[2]; LONGBOTTOM & PEPYS[8]); y la histoplasmosis (BIGUET & col.[4]).

En lo que se refiere a la blastomicosis sudamericana, la técnica aún no ha sido aplicada de manera exhaustiva; pero los datos fragmentarios hasta ahora disponibles nos hacen pensar que aportará información de relevante interés sobre la inmunologia de esta enfermedad.

En efecto, FERRI[6], FAVA NETTO[5], LACAZ & col.[7], y particularmente RESTREPO[11], han destacado el interés de las pruebas serológicas que ponen en evidencia anticuerpos precipitantes, demostrando que más del 80% de los casos activos estudiados poseían precipitinas detectables por las diferentes reacciones empleadas. La prueba de doble

(1) Laboratorio de Inmunología Parasitaria
M.S.P. — Colonia Saint-Bois
Casilla de Correo 1737
Montevideo, Uruguay

difusión en gel de agar utilizada por RESTREPO [11] probo además poseer alta especificidad, cualidad imprescindible para toda prueba de importancia diagnóstica.

Por otra parte LACAZ & col. [7] y NEGRONI [9], han referido el hallazgo de precipitinas, mediante el análisis inmunoelectroforético, en sueros de enfermos de blastomicosis sudamericana, aúnque no dedican mayores consideraciones a sus resultados.

Estas observaciones nos han inducido a ...gramar diversas experiencias orientadas a determinar la composición teórica de ex...tos antigénicos de *Paracoccidioides brasiliensis;* el orden de aparición de los anticuerpos precipitantes en la blastomicosis sudamericana experimental; y las características fundamentales de las precipitinas elaboradas en la enfermedad humana.

En esta comunicación inicial nos proponemos analizar los resultados obtenidos aplicando la inmunoelectroforesis al estudio de 20 casos humanos de blastomicosis sudamericana, confrontando esos hallazgos con los proporcionados por la técnica de doble difusión en gel de agarosa.

MATERIALES Y METODOS

1) *Antígenos* — Para preparar nues...os antígenos empleamos las cepas IHM 891 ... IHM 1437 de *P. brasiliensis;* la IHM 1523 de *Histoplasma capsulatum;* y la No. 120 de *Blastomyces dermatitidis*, conservada en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina y Farmacia de Lille.

La cepa IHM 891 fue inicialmente clasificada como *Glenosporella loboi*, pero ARTAGAVEYTIA-ALLENDE & MONTEMAYOR [1] demostraron que se trataba de *P. brasiliensis*, basándose en sus caracteres morfológicos y biológicos. La hemos incluído en nuestro trabajo porque estudios previos, realizados con S. ANDRIEU en el Laboratorio del Prof. J. BIGUET, nos han demostrado que posee una antigenicidad remarcable.

Para enriquecer los extractos de *P. brasiliensis* transplantamos conjuntamente trozos de cultivos de 7 días de la fase filamentosa de ambas cepas, obtenidos en agar Sabouraud a 28-30°C. a frascos de 500 ml conteniendo cada uno 100 ml de caldo Sabouraud, incubándolos a 28-30°C durante 3 meses. Finalizado ese período separamos el micelio del medio de cultivo mediante filtración, preparando entonces 3 tipos de antígenos: a) "bruto"; b) "celular" y c) "metabólico".

1.1 *Antígeno "bruto"* — Separamos 50 gm de micelio y lo lavamos 3 veces con agua destilada, secándolo luego cuidadosamente entre varias hojas de papel de filtro. Posteriormente agregamos 25 ml de Cl Na 0.018 M, y lo trituramos mecánicamente a 17.000 rpm durante 1 hora. Liofilizamos la pasta asi obtenida, denominando al producto seco, antígeno "bruto".

1.2 *Antígeno "celular"* — Rediluímos el antígeno "bruto" en Cl Na 0.018 M, sometiéndolo luego a la acción de sucesivas congelaciones y descongelaciones, y a trituración en mortero de porcelana.

Después de 24 hs centrifugamos la suspensión resultante (10.000 rpm durante 1 hora), sometiendo el sobrenadante a nueva centrifugación (20.000 rpm durante 1 hora). Luego dializamos este segundo sobrenadante durante 48 horas contra agua destilada, liofilizando la solución dializada. El producto seco obtenido, constituyó el antígeno "celular".

1.3 *Antígeno "metabólico"* — Dializamos el medio de cultivo anteriormente separado del micelio, durante 12 horas contra agua corriente, y durante 48 horas contra agua destilada. Al cabo de ese tiempo liofilizamos la solución originandose el antígeno "metabólico".

El preparado antigénico empleado en todas las pruebas efectuadas en este trabajo fue una mezcla de partes iguales de antígeno "celular" y antígeno "metabólico", a la que denominamos antígeno "mixto".

El procedimiento seguido con las cepas de *H. capsulatum* y *B. dermatitidis* fue enteramente similar al empleado con *P. brasiliensis*.

2) *Sueros* — Utilizamos muestras de sueros de 185 individuos: 50 donantes de sangre considerados normales, 50 enfermos de hidatidosis, 50 tuberculosis, 20 pacientes de blastomicosis sudamericana, 10 portadores de aspergilosis del aparato respiratorio, y 5 afectados por histoplasmosis.

..DAL, L. A. — Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomicosis sudamericana revela-
..os por inmunoelectroforesis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13:320-327, 1971.

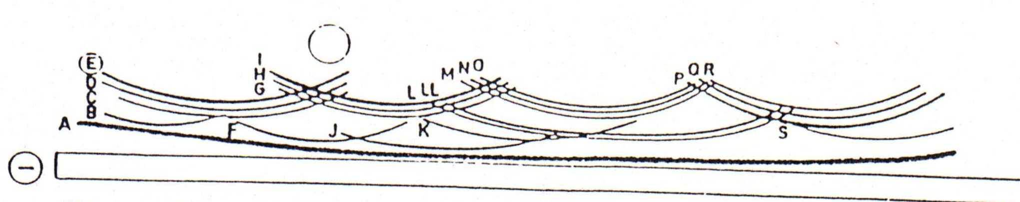


Fig. 1 — Representación esquemática de los arcos de precipitación formados por los sueros de pacientes de blastomicosis sudamericana, frente a antígeno "mixto" de *P. brasiliensis*

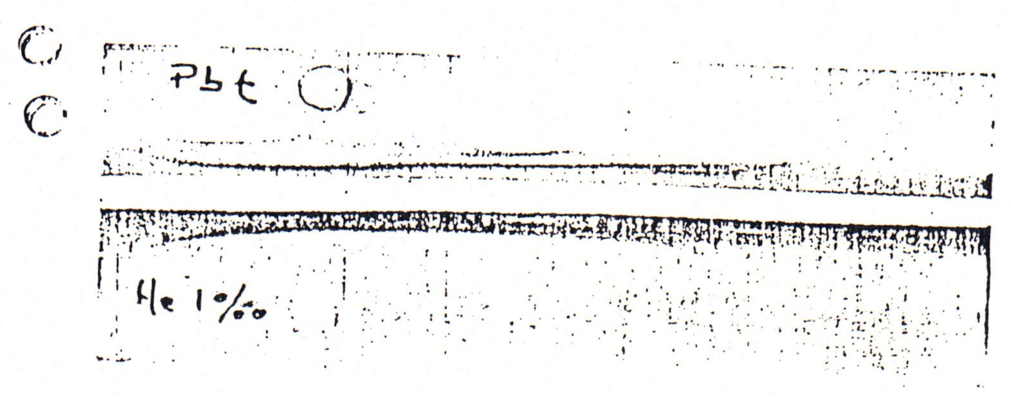


Fig. 2 — Inmunoelectroforesis del suero no. 2748. Se aprecian con mayor nitidez los arcos A, E, I, O y P. El arco A se observa también ante el antígeno metabólico de *H. capsulatum*

Las muestras correspondientes a 13 de los casos de blastomicosis sudamericana, nos fueron proporcionadas por el Prof. A. T. LONDERO, las 7 restantes fueron extraídas de enfermos estudiados en nuestro Laboratorio a partir de 1964. Todos los enfermos tenían lesiones activas en el momento de la extracción de la sangre.

Los sueros fueron conservados a -20°C, sin sustancia preservativa, hasta el momento de su empleo, y concentrados por 3 en ese momento, mediante liofilización. Los enfrentamos sin inactivar a una solución de 200 mg/ml de los extractos antigénicos "mixtos" de *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* y *B. dermatitidis*.

3) *Técnicas inmunologicas*

3.1 *Doble difusión* — Fue realizada de acuerdo con la metodologia propuesta por OUCHTERLONY [10], debiendo señalar como única variante, el empleo de agarosa como soporte.

3.2 *Inmunoelectroforesis* — Empleamos la técnica recomendada por BICUET & col. [3]. Las láminas medían 10.5 x 5.5 cm. y la duración de la corrida electroforética fue de 5 hs 30.

3.3 *Coloración* — Para revelar las bandas y los arcos de precipitación recurrimos al método de Amidoschwarz.

RESULTADOS

1. *Doble difusion*

1.1 *Pacientes con Blastomicosis sudamericana* — Diecinueve de los 20 casos dieron origen a bandas de precipitación frente a antígeno de *P. brasiliensis*; 16 demostraron poseer anticuerpos precipitantes contra el extracto de *H. capsulatum*; y 15 dieron reacciones positivas ante *B. dermatitidis* (Cuadro I).

Aunque el número de bandas de precipitación siempre fue mayor frente al antígeno homólogo, creemos importante destacar que la reacción de doble difusión no nos permitió, en la mayoría de los casos, formular un diagnóstico inmunológico enteramente seguro, debido a la importancia de

CUADRO I

Resultados de la doble difusión en 20 casos de blastomicosis sudamericana

Sueros	Número de bandas reveladas por los antígenos de		
	P. brasiliensis	*B. dermatitidis*	*H. capsulatum*
2130 *	0	0	0
2340 *	4	0	2
2449 *	5	4	3
2488 *	1	0	0
2592 *	4	3	1
2534 *	3	1	1
2505 *	4	2	2
2571 *	2	0	0
2703 *	1	0	0
2744 *	8	3	4
2748 *	9	3	3
2778 *	7	2	1
2783 *	3	2	2
64036	8	4	4
67007	9	4	3
67141	12	5	5
68125	8	3	4
70135	7	4	3
70220	5	2	2
70336	7	4	4

* Muestras enviadas por el Prof. A. T. Londero

las reacciones cruzadas, y a que no pudimos identificar bandas específicas con este método.

Después de la coloración aparecieron, en algunas láminas, bandas de precipitación que no resultaban evidentes en las láminas frescas.

El número de anticuerpos precipitantes revelados por el antígeno de *P. brasiliensis* varió entre 1 y 12; *B. dermatitidis* y *H. capsulatum* pusieron de manifiesto de 1 a 5 precipitinas en el grupo de enfermos correspondiente.

En los casos que generaron reacciones cruzadas, las bandas más cercanas al depósito del suero correspondían a reacciones de identidad total, demostrando la presencia de facciones antigenicas comunes a las 3 especies de hongos.

1.2 *Pacientes con histoplasmosis* — Los 5 enfermos de este grupo demostraron poseer anticuerpos precipitantes contra *H. capsulatum*; 4 reaccionaron contra *P. brasiliensis* y 3 de éstos contenían, además, precipitinas contra *B. dermatitidis* (Cuadro II).

CUADRO II

Resultados de la doble difusión en 5 casos humanos de histoplasmosis

Sueros	Número de bandas reveladas por los antígenos de		
	H. capsulatum	*B. dermatitidis*	*P. brasiliensis*
64.009	4	0	0
64.048	5	1	1
64.085	6	1	1
64.103	5	0	1
70.354	7	1	2

El número de anticuerpos revelados, varió entre 4 y 7, frente al antígeno homólogo: entre 1 y 2 frente a *P. brasiliensis*; y no pasó de 1 banda ante *B. dermatitidis*.

1.3 *Pacientes con otras afecciones e individuos normales* — En el grupo de sueros extraídos de donantes de sangre, enfermos de hidatidosis, tuberculosos y portadores de aspergilosis del aparato respiratorio, no encontramos anticuerpos precipitantes contra los antígenos fúngicos utilizados.

2. *Inmunoelectroforesis*

2.1 *Pacientes con blastomicosis sudamericana* — Los 19 enfermos que dieron pruebas de doble difusión positivas, originaron arcos de precipitación en los inmunoelectroforegramas realizados con antígeno *P. brasiliensis* (Cuadro III). El número de sistemas precipitantes varió entre 1 y 13. En la Fig. 1 se han esquematizado todos los arcos revelados en la casuística examinada. Se trata de 20 sistemas precipitantes provisoriamente caracterizados por las 20 primeras letras de nuestro abecedario, comenzando desde el cátodo.

Cada uno de estos sistemas ha aparecido con frecuencia variable en el suero de nuestros enfermos, lo que se ha expuesto en el Cuadro III. El arco E, caracterizado por

ZABAL, L. A. — Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomicosis sudamericana revelados por inmunoelectroforesis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13:320-327, 1971.

CUADRO III

Sistemas precipitantes revelados por inmunoelectroforesis en sueros de pacientes de blastomicosis sudamericana con antigeno *P. brasiliensis*

Sueros	No. de Arcos	Arcos presentes
2130	0	—
[illegible]	4	D. E. F. G.
2449	7	D. E. I. L. K. O. R.
2488	1	E.
[illegible]	8	D. E. K. L. M. N. O. P.
2534	3	D. E. K.
2565	7	A. D. E. M. I. O. P.
2571	2	D. E.
2703	1	E.
2744	8	A. D. E. N. O. P. Q. S.
2748	10	A. B. D. E. H. I. K. N. O. P.
2778	7	D. E. F. I. K. O. P.
2783	8	A. D. E.
64036	3	A. D. E. H. I. P. Q. S.
67007	9	D. E. H. I. L. N. O. P. R.
67141	13	E. G. H. I. J. L. LL. N. O. P. Q. R. S.
68125	7	D. E. F. G. J. M. P.
70135	5	D. E. F. K. L.
70220	6	D. E. G. L. O. P.
70336	7	C. D. E. G. L. N. O.

tener migración catódica, y ser un arco mayor de los diagramas, fue identificado en todos los sueros reactivos.

Le siguen en frecuencia el arco D, también de migración catódica, presente en 16 casos; y los arcos O y P, de migración anódica, revelados en 10 de los pacientes.

El análisis de los antígenos "celular" y "metabólico" por separado, mostró que las fracciones de migración catódica que generan los arcos E y D se encuentran en el extracto obtenido a partir del medio de cultivo.

Los 16 pacientes que habían dado origen a reacciones positivas en la doble difusión frente a antígeno de *H. capsulatum*, y los 15 que presentaban bandas de precipitación en la misma técnica ante *B. dermatitidis*, fueron también reactivos en la inmunoelectroforesis (Cuadro IV).

El número de sistemas precipitantes revelados por ambos extractos varió entre 1 y 5.

En ningúno de estos casos fue posible identificar, con los antígenos heterólogos, arcos de migración catódica similares a aquellos designados con las letras C, D y E.

El arco A, espeso, largo y poco neto, apareció en múltiples oportunidades, no poseyendo los caracteres clásicos e las reacciones antígeno anticuerpo.

2.2 *Pacientes con histoplasmosis* — En el suero de los 5 enfermos con histoplasmosis la inmunoelectroforesis puso en evidencia anticuerpos precipitantes contra *H. capsulatum* en número variable entre 5 y 7 (Cuadro V).

CUADRO IV

Reacciones cruzadas demostradas por inmunoelectroforesis en la blastomicosis sudamericana

Sueros	Número de arcos revelados con antígeno de	
	B. dermatitidis	*H. capsulatum*
2130	0	0
2310	0	2
2449	4	3
2488	0	0
2512	3	1
2534	1	1
2565	2	2
2571	0	0
2703	0	0
2744	3	4
2748	3	3
2778	2	1
2783	2	2
64036	4	4
67007	4	3
67141	5	5
68125	3	4
70133	4	3
70220	2	2
70336	4	4

CUADRO V

Resultados de la inmunoelectroforesis en 5 casos humanos de histoplasmosis

Sueros	Número de sistemas precipitantes revelados con antigeno de		
	H. capsulatum	*B. dermatitidis*	*P. brasiliensis*
64009	5	0	0
64048	5	1	1
64085	6	1	1 a 2
64103	6	0	1
70354	7	1 a 2	2

Cuatro de esos enfermos tenían anticuerpos contra *P. brasiliensis* y 3 dieron arcos de precipitación frente a *B. dermatitidis*, variando entre 1 y 2 el número de sistemas precipitantes inespecíficos revelados.

En ningún caso apreciamos sistemas precipitantes de migración catódica con las características del arco E descrito en las blastomicosis sudamericana.

2.3 *Pacientes con otras afecciones e individuos normales* — Este grupo de sueros no poseía anticuerpos precipitantes, demostrables por inmunoelectroforesis, contra los antígenos utilizados.

COMENTARIOS

Los resultados expuestos, prueban que actuando con concentraciones adecuadas de antígenos y sueros, es posible demostrar anticuerpos precipitantes, en número variable, en la mayor parte de los pacientes de blastomicosis sudamericana, mediante la inmunoelectroforesis.

Esta técnica revela también precipitinas contra los agentes de la blastomicosis norteamericana y de la histoplasmosis, poniendo así de manifiesto varias fracciones antigénicas comunes entre *P. brasiliensis*, *B. dermatitidis* y *H. capsulatum*.

La distribución particular que adoptan los distintos sistemas precipitantes en los inmunoelectroforegramas, contribuye a diferenciar los arcos específicos de la blastomicosis sudamericana, de aquellos que son consecuencia de reacciones cruzadas.

En efecto, los sistemas de migración catódica sólo han sido formados frente al antígeno homólogo, y uno de ellos, el arco E, apareció en todos los casos positivos, lo que le confiere gran interés diagnóstico. Igualmente específicos parecen los arcos C y D, pero su frecuencia es notablemente inferior.

Los arcos inespecíficos se distribuyen, a diferencia de los anteriores, en el sector anódico de los diagramas.

Una explicación lógica para esta particular disposición de los sistemas precipitantes específicos podría encontrarse en los hallazgos de VAUCELLE [13]. Esta autora estudió, mediante electroforesis en agarosa, extractos antigénicos purificados de *H. capsulatum*, *H. duboisii*, *B. dermatitidis* y *P. brasiliensis*, observando que el agente de la blastomicosis sudamericana se diferencia de los demás por poseer un componente proteico de migración catódica. La caracterización inmunoelectroforética de las actividades enzimáticas de los sistemas precipitantes formados por hiperinmunosueros experimentales de conejo anti-*P. brasiliensis*, le permitió individualizar, en el sector catódico de sus diagramas, un arco portador de la acción fosfatasa alcalina.

El anticuerpo que participa en la formación de ese arco aparece precozmente en el curso de la inmunización experimental, puesto que VAUCELLE [13] lo reveló desde el 14.° día a partir de la primera inyección de antígeno.

La comparación de los documentos fotográficos publicados en la tesis de VAUCELLE, con nuestros propios diagramas, nos lleva a la sospecha de que nuestro arco E corresponda a ese sistema de aparición precoz, portador de una actividad enzimática fosfatasa alcalina, hipótesis que trataremos de verificar en futuros estudios.

Sobre estas bases parece justificado sostener que la presencia del arco E en un inmunoelectroforegrama autoriza a formular el diagnóstico de blastomicosis sudamericana.

En otro orden de cosas, la demostración de fracciones antigénicas comunes entre *P. brasiliensis*, *B. dermatitidis* y *H. capsulatum*, está en aparente contradicción con lo observado por RESTREPO [11] con la prueba de doble difusión, puesto que la autora colombiana enfatiza la ausencia de reacciones cruzadas en sueros de pacientes con histoplasmosis, blastomicosis norteamericana, coccidioidomicosis y esporotricosis.

Sin embargo es necesario remarcar que nosotros hemos trabajado con sueros concentrados a 1/3 de su volumen inicial, con una solución antigénica que contenía 200 mg/ml de extracto "mixto" de *P. brasiliensis*, y empleando agarosa como soporte de las reacciones: mientras que RESTREPO utilizó sueros sin concentrar, antígeno metabólico de paracoccidioides a una concentración notablemente menor, y gel de agar como soporte.

Estas diferencias metodológicas deben ser a causa fundamental de las diferencias en os resultados, y explicarían satisfactoriamente la detección de un número de anticuerpos sensiblemente mayor en los pacientes estudiados, por nosotros.

La falta de reactividad comprobada en el grupo de enfermos tuberculosos sugiere que la doble difusión y la inmunoelectroforesis pueden contribuir a un mejor conocimiento de las formas pulmonares de la blastomicosis sudamericana, si son empleadas sistemáticamente en aquellos enfermos que, siendo portadores de lesiones pulmonares de tipo inflamatorio crónico, no han dado pruebas concluyentes de la etiología micobacteriana de las mismas.

SUMMARY

Specific precipitant antibodies in South American blastomycosis revealed by immunoelectrophoresis

Immunoelectrophoresis was applied to the study of 20 patients of South American blastomycosis (= paracoccidioidomycosis).

The antigen was prepared mixing an equal quantity of "cellular" and "metabolic" extracts of the mycelial phase of *P. brasiliensis*.

Precipitating antibodies against this antigen were demonstrated in the sera of 19 of the studied patients, varying from 1 to 13.

The analysis of all the immunoelectrophoregrams permitted the identification of 20 antigenic fractions in the employed antigen.

One of these fractions was characterized by its cathodic migration. It was revealed by all positive sera, giving a major arc temporary called arc E.

This precipitant system was not formed when heterologous antigens (*H. capsulatum*, *B. dermatitidis*) were employed.

The double diffusion technique was positive in the same cases, generating from 1 to 12 precipitation bands.

Both proofs revealed that an appreciate number of South American blastomycosis patients, had antibodies against *H. capsulatum* and *B. dermatitidis*.

Four out of five cases of histoplasmosis reacted against *P. brasiliensis* extract.

In three of them we could also demonstrate the presence of precipitines against *B. dermatitidis*.

None of the sera from patients with histoplasmosis formed the arc E.

AGRADECIMIENTOS

El Autor expresa su reconocimiento a los Profesores J. Biguet y A. Capron, asi como a la Srta. S. Andrieu de la Facultad de Medicina y Farmacia de Lille, por sus invalorables consejos; al Prof. A. T. Londero de la Facultad de Medicina de Santa María, R. G. S., Brasil, por haberle proporcionado sueros de sus pacientes; al Prof. J. E. Mackinnon de la Facultad de Medicina de Montevideo, Uruguay, por la lectura crítica del original: y a las Srtas. Martha Josef e Isabel Vigna, por su asistencia técnica.

REFERENCIAS

1. ARTAGAVEYTIA-ALLENDE, R. C. & MONTEMAYOR, L. — Estudio comparativo de varias cepas de *Paracoccidioides brasiliensis* y especies afines. *Mycopathologia* (Den Haag) 4:356-366, 1949.

2. BIGUET, J.; TRAN VAN KY, P.; CAPRON, A. & FRUIT, J. — Analyse immunoélectrophorètique d'extraits cellulaires et de milieux de culture de malades atteints d'aspergillomes bronchopulmonaires. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris) 107:72-97, 1964.

3. BIGUET, J.; TRAN VAN KY, P. & ANDRIEU, S. — L'Analyse immunoélectrophorétique des structures antigéniques fongiques. *Bull. Soc. Pharm.* (Nancy) 71:6-25, 1966.

4. BIGUET, J.; TRAN VAN KY, P.; ANDRIEU, S. & VAUCELLE, T. — Première caractérisations d'activitées enzymatiques sur les immunoélectrophorègrammes des extraits antigéniques de *Histoplasma capsulatum*. Conséquences diagnostiques pratiques. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* 47:425-434, 1967.

5. FAVA-NETTO, C. — Contribuição para o estudo immunológico da Blastomicose de Lutz. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* (São Paulo) 21: 99-194, 1961.

6. FERRI, R. G. — Estudo imunoquímico de antígenos intracelulares. *Hospital* (Rio) 59: 917-924, 1961.

YARZABAL, L. A. — Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomicosis sudamericana revelados por inmunoelectroforesis. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 13:320-327, 1971.

7. LACAZ, C. da S.; FERRI, R. G.; FAVA NETTO, C. & BELFORT, E. — Aspectos imunoquímicos na blastomicose sul americana e blastomicose queloidiana. *Med. Cir. Farm.* 208:63-74, 1962.

8. LONGBOTTOM, J. L. & PEPYS, J. — Pulmonary aspergillosis. Diagnostic and immunological significance of antigens and C substance in *Aspergillus fumigatus*. *J. Path. Bact.* 88:141-151, 1964.

9. NEGRONI, R. — Las micosis broncopulmonares en la República Argentina. *Torax* (Montevideo) 19:67-75, 1970.

10. OUCHTERLONY, O. — In vitro method for testing the toxin producing capacity of *Diphteria* bacteria. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 25:186-191, 1948.

11. RESTREPO, A. — La prueba de inmunodifusión en el diagnóstico de la paracoccidioidomicosis. *Sabouraudia* 4:223-230, 1966.

12. TRAN VAN KY, P.; URIEL, J. & ROSE, F. — Caractérisation des types d'activités enzymatiques dans les extraits antigéniques d'*Aspergillus fumigatus* après électrophorèse et immunoélectrophorèse en agarose. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris) 111:161-170, 1966.

13. VAUCELLE, T. — *Contribution à l'étude immunologique des histoplasmoses*. Tesis de doctorado. Francia, Facultad Mixta de Medicina y Farmacia de Lille, 1969.

Recebido para publicação em 7/1/1971.